

# Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores

Oscar Flórez Vargas<sup>1,3</sup>, Clara Isabel González Rugeles<sup>2,3</sup>

El diagnóstico a nivel de los laboratorios de Patología está aprovechando las ventajas que ofrecen las técnicas moleculares, entre ellas la alta sensibilidad, especificidad, estabilidad y fácil manipulación del DNA. La utilidad de los datos obtenidos a partir del análisis de tejidos está directamente relacionada con la calidad de la muestra, la cual se puede ver afectada por las condiciones de manejo y almacenamiento que pueden contribuir a su deterioro o degradación. En este estudio se determinó la calidad y la integridad del DNA extraído de tejido cardíaco, por análisis en electroforesis de agarosa y amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de fragmentos de diferentes tamaños. Adicionalmente se analizó la presencia de DNA de *Trypanosoma cruzi*. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el tejido se congeló sin la utilización de fijadores. De los fijadores el que mostró los mejores resultados fue la formalina tamponada antes de su uso y el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . *Salud UIS* 2004;36:56-64

**Palabras clave:** fijadores de tejidos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), almacenamiento, patología molecular, tejidos

The diagnosis in Pathology is taking advantages offered by molecular approach, including, high sensibility, specificity, stability and facility to manipulate DNA. The usefulness of data obtained from tissue analysis is related to specimen quality, which may be affected by conditions of manipulation and storage that may contribute to its degradation. In this report the quality and integrity of DNA obtained from cardiac tissues was measured for electrophoretic pattern and specific amplified polymerase chain reaction (PCR) products to different sizes. DNA to *T. cruzi* was also amplified. Best results for PCR products were obtained with frozen tissues without fixatives. Buffered-Formaline and incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  was the best fixative. *Salud UIS* 2004;36:56-64

**Key words:** tissues-fixatives, polymerase chain reaction (PCR), storage, molecular pathology, tissues

## INTRODUCCIÓN

La Patología clínica y la molecular han sufrido una transformación que ha llevado desde el estudio histopatológico, pasando por la utilización de la inmunohistoquímica hasta las técnicas moleculares. Estas últimas empezaron con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ*, continuando con la transcripción inversa-PCR (RT-PCR), Northern-blot<sup>1</sup> y en la actualidad, dados los avances tan acelerados de la biotecnología, con la utilización de los biochips de DNA y la proteómica.<sup>2</sup> Apartir del tamizaje de muestras de tejidos de archivo se han identificado nuevos genes en cánceres humanos<sup>3,4</sup> y aún más importante, en

determinadas condiciones clínicas se ha visto la importancia de las pruebas moleculares diagnósticas.<sup>2</sup>

La utilidad científica de los datos obtenidos a partir del análisis de los tejidos está directamente relacionada con la calidad de la muestra de tejido. Este debería representar lo más cercanamente posible el tejido *in vivo* pero existen algunos factores, incluyendo el tipo de tejido, la hipoxia antes de la excisión, el método de preservación, el tipo y tiempo de almacenamiento, la congelación y descongelación y los métodos de extracción, que afectan la calidad de las biomoléculas<sup>5</sup>. Por ello es importante definir las condiciones de manejo de los tejidos para poder utilizarlos en los análisis moleculares. Una complicación adicional es el hecho de que su procesamiento no está estandarizado en los laboratorios de Patología, representando una fuente de variabilidad que afecta la calidad de los ácidos nucleicos y por ende la confiabilidad de los ensayos. La variabilidad está dada principalmente por el uso de diferentes fijadores, las condiciones de temperatura y el tiempo en el cual permanecen en ellos, antes de ser incluidos en parafina o ser utilizados. Existen dos clases de fijadores, los precipitantes y los entrecruzantes. Los precipitantes como el etanol, el metanol y la acetona preservan las biomoléculas pero la morfología no se conserva, por el

1. Bacteriólogo Universidad Industrial de Santander.

2. Bacterióloga. MsC. Inmunología. PhD. Profesor asociado. Escuela de Bacteriología. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga-Colombia.

3. Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular. GIEM. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander.

**Correspondencia:** Clara Isabel González. E-mail: [cig@uis.edu.co](mailto:cig@uis.edu.co). Dirección: Carrera 32 No. 29 – 31. Oficina 407. Facultad de Salud UIS. Bucaramanga-Colombia. Teléfono: 6348228 - 6344000 Ext. 3198 - 3196

Recibido Septiembre 14 de 2004 / Aceptado Octubre 16 de 2004

contrario, los entrecruzantes, tales como el formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído preservan la morfología pero la preservación y recuperación de las biomoléculas no es buena.<sup>6</sup>

El método más ampliamente utilizado en los laboratorios de Patología es la fijación con formalina al 10% y posterior inclusión en parafina. El uso de este método se prefiere por la facilidad en el almacenamiento y el transporte. Esta solución de “formalina al 10%” ha llevado a mucha confusión porque realmente tiene una concentración aproximada de formaldehído de 3,7 % (w/v), ya que se toma a partir de una solución madre de aproximadamente 37% y se diluye 10 veces<sup>7</sup>. Las condiciones recomendadas para la fijación de las biopsias son, el uso de formaldehído tamponado durante 24 horas a 4 °C en oscuridad antes de incluir el tejido en parafina. En la realidad esto no ocurre y las muestras pueden permanecer fines de semana a temperatura ambiente y en muchos casos permanecen meses e incluso años. Este tiempo afecta la calidad del DNA debido a que el papel de la formalina es producir entrecruzamiento con las proteínas, principalmente histonas que ayudan a mantener el empaquetamiento del DNA en los cromosomas, de esta forma previene que la doble hélice de DNA se libere del complejo. La formalina penetra el tejido en una proporción de 0,5 mm/h, por lo tanto, entre mayor tiempo permanezca el tejido en el fijador, mayor será el entrecruzamiento y el DNA se puede fragmentar<sup>6,8</sup> o el entrecruzamiento tan fuerte impide su extracción<sup>8-10</sup>. El tamaño de los fragmentos producidos por el efecto de la fijación depende del tipo de tejido y las condiciones del proceso, la mayoría de los estudios reportan la generación de pequeños fragmentos de entre 200 a 500 pb<sup>7,11</sup>.

Las técnicas moleculares en general, presentan ventajas relacionadas con la estabilidad misma del DNA, su sencilla manipulación y los altos niveles de sensibilidad y especificidad de los métodos para detectarlo<sup>12</sup>. En la actualidad, la PCR es el método molecular más ampliamente utilizado con excelentes resultados tanto en diagnóstico, pronóstico, como seguimiento y tratamiento de enfermedades de todo tipo. Adicionalmente, tiene gran utilidad y amplio uso en la genotipificación de muchos organismos<sup>12</sup>. En las muestras patológicas sería una técnica igualmente útil, pero se ve afectada por los procedimientos a que son sometidos los tejidos para su preservación y almacenamiento. Las limitaciones están dadas por la presencia de inhibidores como sales, EDTA, parafina y formalina o la fragmentación del DNA como se mencionó anteriormente<sup>7,11,13</sup>. La fragmentación y entrecruzamiento del DNA afectan tanto la calidad como la cantidad del

DNA obtenido, llevando a que sólo se puedan amplificar fragmentos con tamaños menores de 500 pb<sup>6,10,11,14-20</sup>. En ensayos de RT-PCR usando RNA de hígado, incubado en diferentes tiempos con formalina tamponada y amplificando fragmentos desde 133 hasta 4035 pb se observó como, a medida que aumentaba el tiempo de fijación disminuía la capacidad de amplificación de fragmentos de mayor tamaño<sup>21</sup>. Adicionalmente, en estudios con diversos genes a amplificar, se ha demostrado la disminución de la sensibilidad de la PCR como consecuencia de los métodos utilizados para preservar los tejidos. Ejemplo de ello son genes humanos como los de citocromo p450<sup>19</sup>, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)<sup>16</sup> y APC<sup>22</sup> y en microorganismos el rRNA 18s de *H. capsulatum*<sup>14</sup> y *M. tuberculosis* en biopsias hepáticas<sup>23</sup>.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro métodos de almacenamiento de tejidos: bajas temperaturas sin el uso de fijadores, bajas temperaturas con fijadores como alcohol al 70% (precipitante), formalina tamponada (entrecruzante) y muestras incluidas en parafina, sobre la amplificación de fragmentos de diferentes tamaños de genes humanos y de *Trypanosoma cruzi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Biopsias

Se utilizaron biopsias de tejido cardíaco obtenidas en el Departamento de Patología de la UIS. Las biopsias se almacenaron durante 15 meses a -20 °C en formalina tamponada, en alcohol al 70% y sin medio de preservación. Adicionalmente una muestra se incluyó en parafina con previa fijación en formalina, según el método usado en Patología. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Digestión de las biopsias

Cada una de las biopsias se dividió en tres secciones con tamaños que oscilaban entre 3-5mm<sup>3</sup>, excepto la biopsia embebida en parafina de la cual se hicieron seis cortes de 4 µm por cada sección. La desparafinación se hizo siguiendo el método xileno/etanol<sup>19</sup>. Cada sección de biopsia previo al proceso de digestión se lavó tres veces con una solución de PBS pH 7,4 (137 mM de NaCl, 2,68mM de KCl, 1,47mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 9,03mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·x2H<sub>2</sub>O), para eliminar la presencia del fijador que puede inhibir el proceso de digestión. Posteriormente se realizó la digestión en tubos de 1,5 mL en buffer Tris-HCl 100mM, EDTA 0,04 M pH 8,0, SDS 0,5 % y 5 µL de proteinasa K (20mg/mL) a 56 °C hasta cuando no se observaron fragmentos de tejido, indicador de una completa digestión.

### Extracción de DNA

La extracción del DNA se realizó utilizando un kit comercial (CorpoGen; Santa Fe de Bogotá, Colombia). El DNA obtenido se resuspendió en un volumen final de 20 uL.

### Electroforesis del DNA

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,2 % corridos durante 30 minutos. El DNA se visualizó en un transiluminador con el uso de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular del DNA se utilizó *lambda/Hind III* (Promega Corporation; U.S.A.).

### Amplificación por PCR

Se usaron iniciadores que amplifican fragmentos de diferentes tamaños de DNA humano y DNA del parásito (Tabla 1). Para la amplificación del DNA se utilizó tanto lisado total sin extracción de DNA, como DNA purificado.

- PCR del kinetoplasto de *t. cruzi*: se emplearon los iniciadores S35/S36 (tabla 1) que amplifican una secuencia de 330 pb ubicada en los minicírculos del DNA del kinetoplasto del parásito. El tampón de reacción de PCR contenía una concentración final de 200 µM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µM de cada iniciador; 2,5 U de TucanTaq DNA polimerasa (CorpoGen) y 1 µL de lisado total o DNA, en un volumen final de 20 µL. Después de una denaturación inicial (5 min a 94 °C) se programaron 25 ciclos de amplificación así: denaturación a 94 °C por 1min, anillamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min<sup>24,25</sup>.

- PCR del núcleo de *t. cruzi*: se emplearon los iniciadores TCZ1/TCZ2 (Tabla 1), que amplifican una secuencia

repetida de 188 pb. El tampón de reacción de PCR contenía una concentración final de 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada iniciador; 0,12 U de TucanTaq DNA polimerasa (CorpoGen) y 1 µL de lisado total o DNA en un volumen final de 20 µL. Después de una denaturación inicial (5 min a 94 °C) se programaron 45 ciclos de amplificación así: denaturación a 94 °C por 1 min, anillamiento a 57 °C por 10s y extensión a 72 °C por 30s, con una extensión final a 72 °C por 7 min.<sup>24,25</sup>

- PCR de hormona del crecimiento humano: se emplearon los iniciadores HCHF/HCHR (Tabla 1) que amplifican una secuencia de 450 pb presente en el núcleo y de copia única. El buffer de reacción de PCR contenía una concentración final de 200 µM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µM de cada iniciador; 0,6U de TucanTaq DNA polimerasa (CorpoGen) y 1 µL de lisado total o DNA en un volumen final de 20 µL. Después de una denaturación inicial (5 min a 94 °C) se programaron 35 ciclos de amplificación así: denaturación a 94 °C por 1 min, anillamiento a 65 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min<sup>26</sup>.

- PCR de HLA *DR-B*: se emplearon los iniciadores A/B (Tabla 1) que amplifican una secuencia de 280 pb presente en el núcleo y de copia única. El buffer de reacción de PCR contenía una concentración final de 200 µM de dNTPs, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada iniciador; 0,25 U de TucanTaq DNA polimerasa (CorpoGen) y 1 µL de lisado total o DNA en un volumen final de 20 µL. Después de una denaturación inicial (30 s a 95 °C) se programaron 32 ciclos de amplificación así: denaturación a 95 °C por 1 min, anillamiento a 60 °C por 1min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min.<sup>27</sup>

**Tabla 1.** Secuencias de los iniciadores usados en los ensayos de PCR. \*pb= pares de bases; kDNA= DNA del kinetoplasto; nDNA= DNA nuclear del parásito; HCH= hormona del crecimiento humano; HLA DR-B= antígeno leucocitario humano DR; IL-4= interleuquina 4.

DNA blanco	Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón (pb)
kDNA	S35	5' -AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT G- 3'	330
	S36	5' -GGG TTC GAT TGG GGT TGG TG- 3'	
nDNA	TCZ1	5' -CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT- 3'	188
	TCZ2	5' -CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG- 3'	
HCH	HCH F	5' -GCC TTC CCA ACC ATT CCC TT- 3'	450
	HCH R	5' -TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT- 3'	
HLA	HLA A	5' -GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG- 3'	280
DR-B	HLA B	5' -CCG CTG CAC TGT GAA GCT CTC- 3'	
IL-4	IL-4 F	5' -TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT- 3'	195
	IL-4 R	5' -TGG GGA AAG ATA GAG GAA TA- 3'	

- PCR de Interleuquina 4: se emplearon los iniciadores IL-4F/IL-4R (Tabla 1) que amplifican una secuencia de 195 pb presente en el núcleo y de copia única. El buffer de reacción de PCR contenía una concentración final de 200  $\mu$ M de dNTPs, 3 mM de  $MgCl_2$ ; 0,5  $\mu$ M de cada iniciador; 0,025 U de TucanTaq DNA polimerasa (CorpoGen) y 1  $\mu$ L de lisado total o DNA en un volumen final de 20  $\mu$ L. Después de una denaturación inicial (5 min a 94 °C) se programaron 45 ciclos de amplificación así: denaturación a 94 °C por 30 s, anillamiento a 53 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final a 72 °C por 3 min.<sup>28</sup>

- PCR de productos amplificados: se utilizó una alícuota de la primera amplificación como molde para la realización de una segunda PCR, este ensayo sólo se practicó a las secciones de la biopsia incluídas en parafina que no amplificaron en la primera PCR.

### Electroforesis de los amplificados

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,2 % corridos durante 30 minutos. El amplificado se visualizó en un transiluminador con el uso de bromuro de etidio. Como marcador del tamaño del amplificado se utilizó Gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (MBI Fermentas; U.S.A.).

## RESULTADOS

### Digestión de los tejidos y utilización de lisado total

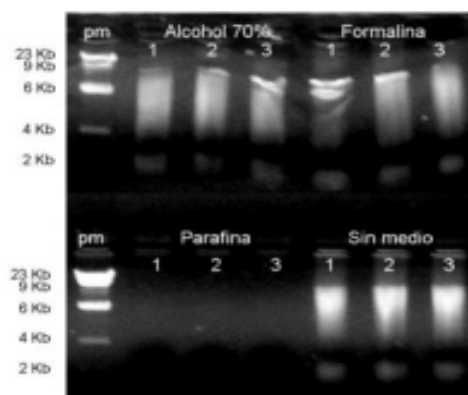
El tiempo de digestión del tejido cuando las biopsias fueron prelavadas con PBS fue de 48 horas comparado con las biopsias sin prelarvar en las cuales no se logró digestión completa luego de 96 horas. Adicionalmente, las biopsias prelavadas no requirieron aumento de la concentración de enzima recomendada (10 $\mu$ g).

En ninguno de los ensayos de PCR en los cuales se utilizó directamente el lisado total para la amplificación, tanto de genes humanos como del microorganismo, se obtuvo amplificación.

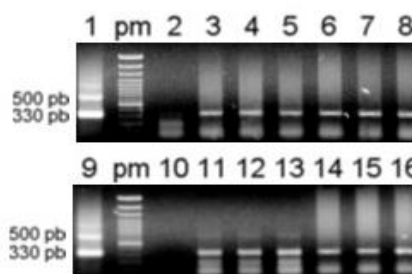
### Calidad e integridad del DNA

La calidad del DNA fue determinada por electroforesis en geles de agarosa y la integridad por amplificación de diferentes genes. En dos de tres ensayos el DNA extraído a partir de las biopsias fijadas en formalina tamponada migró en el gel de agarosa con la presencia de una banda de alto peso molecular bien definida y un bandeo de fragmentos que oscilaron en tamaños de varias kilobases a cientos de pares de bases (Figura 1). En dos de tres ensayos realizados con los tejidos fijados en etanol al 70%, el DNA en el gel de agarosa mostró una banda nítida de alto peso molecular

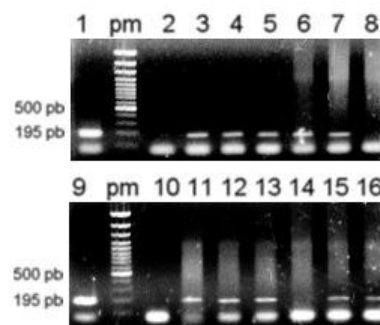
y un barrido de fragmentos de diferentes tamaños. Los tejidos almacenados sin medio de preservación a -20 °C



**Figura 1.** Electroforesis del DNA extraído a partir de biopsias almacenadas en diferentes fijadores.



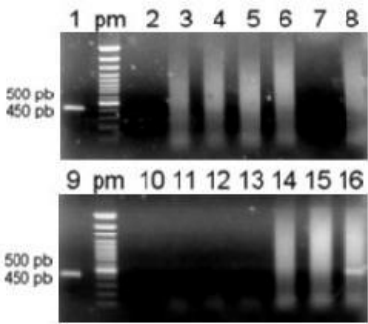
**Figura 2.** Electroforesis de productos amplificados del kDNA de *trypanosoma cruzi*. \*PM = peso molecular, líneas 1 y 9 control positivo, líneas 2 y 10 control negativo, líneas 3-5 biopsia fijada en etanol al 70%, líneas 6-8 biopsia fijada en formalina tamponada, líneas 11-13 biopsia fijada en formalina e inclusión en parafina y líneas 14-16 biopsia almacenada sin medio de preservación a -20°C.



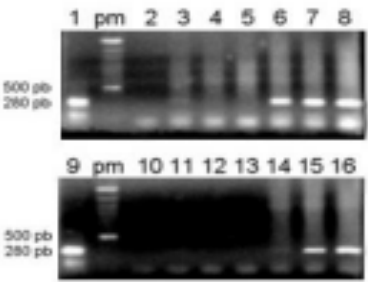
**Figura 3.** Electroforesis de productos amplificados del nDNA de *trypanosoma cruzi*. \*PM = peso molecular, líneas 1 y 9 control positivo, líneas 2 y 10 control negativo, líneas 3-5 biopsia fijada en etanol al 70%, líneas 6-8 biopsia fijada en formalina tamponada, líneas 11-13 biopsia fijada en formalina e inclusión en parafina y líneas 14-16 biopsia almacenada sin medio de preservación a -20°C.

**Tabla 2.** Reacción en cadena de la polimerasa para DNA de *trypanosoma cruzi* y genes humanos (la muestra se analizó por triplicado). La convención utilizada muestra el número de pruebas positivas sobre el total de las pruebas realizadas por cada método de preservación. La relación incluida en paréntesis señala los resultados de la segunda amplificación por PCR.

BIOPSIAS	DNA de <i>T. cruzi</i>		DNA humano		
	kDNA	nDNA	HCH	HLA DR-B	IL-4
Alcohol al 70% (-20 °C)	3/3	3/3	0/3 (2/3)	0/3 (1/3)	3/3
Formalina tamponada (-20 °C)	3/3	2/3	0/3 (3/3)	3/3	3/3
Formalina-Parafina	3/3	2/3	0/3 (3/3)	0/3 (3/3)	0/3 (3/3)
Sin medio (-20 °C)	3/3	3/3	1/3 (2/2)	2/3 (1/1)	3/3

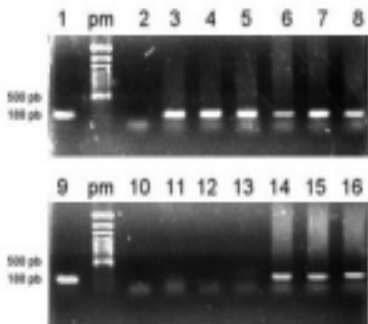


**Figura 4.** Electroforesis de productos amplificados del gen de hormona de crecimiento humano. \*PM = peso molecular, líneas 1 y 9 control positivo, líneas 2 y 10 control negativo, líneas 3-5 biopsia fijada en etanol al 70%, líneas 6-8 biopsia fijada en formalina tamponada, líneas 11-13 biopsia fijada en formalina e inclusión en parafina y líneas 14-16 biopsia almacenada sin medio de preservación a -20°C.



**Figura 5.** Electroforesis de productos amplificados del gen HLA *DR-B*. \*PM = peso molecular, líneas 1 y 9 control positivo, líneas 2 y 10 control negativo, líneas 3-5 biopsia fijada en etanol al 70%, líneas 6-8 biopsia fijada en formalina tamponada, líneas 11-13 biopsia fijada en formalina e inclusión en parafina y líneas 14-16 biopsia almacenada sin medio de preservación a -20 °C.

presentaron varias bandas de alto peso molecular y un bandeo de fragmentos de tamaño variable. En el caso de los tejidos fijados en formalina y posteriormente incluidos en parafina no se observó DNA en la electroforesis en gel de agarosa (Figura 1).



**Figura 6.** Electroforesis de productos amplificados del gen de Interleukina 4. \*PM=peso molecular, líneas 1 y 9 control positivo, líneas 2 y 10 control negativo, líneas 3-5 biopsia fijada en etanol al 70%, líneas 6-8 biopsia fijada en formalina tamponada, líneas 11-13 biopsia fijada en formalina e inclusión en parafina y líneas 14-16 biopsia almacenada sin medio de preservación a -20 °C.

La integridad del DNA ensayada por la amplificación con PCR de genes humanos y de parásito, en los tejidos almacenados en formalina tamponada, mostró amplificación en los dos ensayos utilizados para detectar DNA del parásito y en dos de los tres para detectar genes humanos; no se obtuvo amplificación en el caso del gen de hormona de crecimiento humano. (figuras 2-6, Tabla 2). En las biopsias almacenadas en alcohol se obtuvo amplificación con DNA del parásito y con uno de los tres ensayos de genes humanos (IL-4). Los tejidos fijados en formalina y posteriormente incluidos en parafina mostraron amplificación por PCR solamente del DNA de *trypanosoma cruzi* y no en los genes humanos (figuraa 2-6, Tabla 2). En el caso de las biopsias almacenadas a -20 °C sin medio de preservación se obtuvo amplificación, tanto en los de DNA del parásito como en los de DNA humano (figuras 2-6, Tabla 2). En los casos en los que no se observó amplificación con la primera PCR y se realizó una segunda PCR con una alícuota de la primera, los resultados fueron positivos (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

Las muestras patológicas de archivo son de incalculable valor para hacer estudios moleculares retrospectivos, aprovechando la gran cantidad de tejidos almacenados y el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, que permiten comparar el análisis morfológico con la investigación de los ácidos nucleicos y la correlación clínica. Estos procedimientos posibilitan el estudio de enfermedades genéticas, la identificación de moléculas o marcadores que no se pueden determinar de otra forma, el análisis de los niveles de expresión de proteínas o la presencia de microorganismos que estén en muy bajas concentraciones<sup>29</sup>. Sin embargo, la confiabilidad de los resultados depende de la calidad de la muestra, la cual está directamente relacionada con los métodos utilizados en el procesamiento de los tejidos. Estos métodos garantizan la estabilidad morfológica del espécimen por largos períodos de tiempo<sup>30</sup>, pero la obtención de los ácidos nucleicos puede ser difícil, principalmente por la degradación<sup>6,11,14-17</sup>. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de diferentes condiciones de almacenamiento sobre la calidad del DNA obtenido, evaluado por electroforesis en gel de agarosa y capacidad de amplificación por PCR.

En el proceso de digestión, los tejidos lavados con PBS requirieron un tiempo menor para obtener la digestión total y no se requirió aumentar la concentración de enzima (10 µg) debido a la eliminación de los fijadores en el proceso de lavado. La concentración de proteinasa a utilizar depende de la cantidad y calidad del material; se considera que la digestión proteolítica está correlacionada con el tiempo de fijación<sup>6,8</sup>. Se recomienda llevar a digestión total (tampón claro) y si no es posible, centrifugar para eliminar los restos celulares ya que las proteínas pueden inhibir la PCR.

Numerosos estudios utilizan para el proceso de amplificación el lisado obtenido directamente de la digestión de la muestra, el cual solamente es calentado para denaturar la proteinasa y centrifugado para eliminar restos celulares<sup>6,7,19,32</sup>. La sensibilidad de la PCR es menor cuando se utiliza lisado total comparado con el uso de DNA purificado<sup>19</sup>. En este ensayo no se obtuvo amplificación con el lisado total, probablemente debido a la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa que son eliminados en el proceso de extracción y purificación del material genético. Algunos autores reportan como alternativa el reemplazo del tampón de proteinasa por el de PCR<sup>6</sup> o la dilución 1:10 del lisado<sup>31</sup>.

Rutinariamente para la evaluación histológica, las muestras de tejidos son fijadas en formalina y embebidas en parafina. Aunque la arquitectura del tejido y las proteínas son preservadas, la extracción de los ácidos nucleicos puede ser difícil, produciendo la degradación del material genético<sup>19</sup>. El amplio uso de la formalina está en relación con las ventajas que ofrece, como lo son: el bajo costo, la facilidad de uso, la preservación de las características morfológicas y celulares y su compatibilidad con el uso de técnicas de inmunohistoquímica. De otro lado, el excesivo entrecruzamiento con las proteínas y otras modificaciones sobre los ácidos nucleicos llevan a degradación, fragmentación, metilación y alcalinización del DNA afectando su calidad y cantidad y por lo tanto el desarrollo de la PCR<sup>15-17,21,31-33</sup>.

En este estudio la calidad del DNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa y por amplificación por PCR. En las muestras fijadas en formalina tamponada, según el corrido electroforético en gel de agarosa, el DNA extraído mostró una calidad superior a la obtenida a partir de las muestras que utilizaron otros fijadores como alcohol al 70%, formalina e inclusión en parafina o no uso de fijadores y almacenamiento a -20 °C (Figura 1). El hecho de no observar DNA en la electroforesis en gel de agarosa cuando los tejidos fueron fijados en formalina e incluidos en parafina podría ser debido a una alta fragmentación del DNA, principalmente por la utilización de formalina no tamponada como fijador y almacenada a temperatura ambiente antes de la inclusión del tejido en parafina<sup>21</sup>; también pueden estar relacionados con el tiempo de fijación (2 a 56 horas), que lleva a un mayor entrecruzamiento disminuyendo la cantidad de DNA aislado.

La integridad del DNA demostrada por la amplificación por PCR de genes humanos y de parásito en el caso de formalina tamponada se obtuvo tanto con DNA nuclear como de kinetoplasto del parásito (figuras 2, 3) y en genes humanos con tamaños del fragmento a amplificar menores a 450 pb (figuras 4 - 6). La no amplificación en el caso del gen de hormona de crecimiento humano fue debida probablemente al tamaño del producto a amplificar, siendo esta causa una de las constantes fallas en la amplificación de muestras provenientes de tejidos, dado que la fragmentación y modificaciones irreversibles del DNA ocurren al azar y aumentan en relación con el tiempo de almacenamiento<sup>21</sup>. La recomendación cuando se pretenden amplificar muestras de archivo con tiempos de fijación prolongados es disminuir en lo posible el tamaño de los fragmentos a amplificar<sup>7,9,20-22</sup>. En algunos casos realizar procesos de reconstrucción

o restauración parcial de DNA<sup>6,11</sup>, o cuando se presenta metilación es suficiente con calentar el ácido nucleico antes de la amplificación<sup>21</sup>.

La amplificación sólo de DNA del parásito y no del humano en las PCR de tejidos provenientes de parafina puede explicarse, porque los genes del parásito utilizados como blanco de amplificación son altamente repetidos a diferencia de los genes humanos que son de copia única<sup>20</sup>. Adicionalmente el parásito se encontraba en cantidad suficiente ya que pudieron ser observados por histología.

Las muestras de tejidos óptimas son aquellas que se congelan inmediatamente después de su extracción, sin embargo, este procedimiento no es práctico por el alto costo que representa para los laboratorios. Una buena alternativa sería el uso de fijadores precipitantes como el alcohol. El etanol no se utiliza tan ampliamente como fijador, dado que no es un preservante tan fuerte como la formalina; sin embargo, es un método útil para cuando se requiere aislar RNA para pruebas de RT-PCR, PCR cuantitativa y en general, análisis de expresión de genes<sup>1,21,35</sup>, también sería útil cuando se necesita amplificar fragmentos de DNA de tamaños relativamente altos o cuando se cuenta con biopsias de pequeño tamaño.

La calidad del DNA de las muestras fijadas con alcohol fue adecuada según lo observado en la electroforesis de agarosa. Los resultados de la amplificación por PCR donde se obtuvo amplificación con DNA del parásito y con uno de los genes humanos, no se correlacionan con los publicados, donde la fijación con el alcohol muestra resultados similares en la amplificación a los de la formalina<sup>35</sup>. Nosotros sugerimos que puede ser debido al tiempo en el cual el tejido permaneció en el fijador, ya que está reportado que el aumento en el período de almacenamiento incide directamente en la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos obtenidos<sup>2</sup>; ello explicaría la amplificación únicamente con el gen humano de IL-4 que amplifica el fragmento de tamaño más pequeño.

Vale la pena resaltar que con todos los métodos, excepto parafina, se obtuvo amplificación en los genes humanos cuando el tamaño del fragmento a amplificar fué menor de 200 pb (Figura 6) lo cual estaría de acuerdo con la recomendación de amplificar en lo posible fragmentos pequeños a partir de muestras provenientes de biopsias<sup>6,9,21,37</sup>. Al realizar una segunda PCR con una alícuota de la primera, los resultados fueron positivos corroborando los resultados anteriores e indicando la presencia de amplicones cuya cantidad no alcanzó a ser detectada, probablemente por la sensibilidad de la electroforesis en gel de agarosa (nivel de detección mínimo, 5 ngr (Tabla 2))<sup>14,29,34,35</sup>. Para aumentar la

sensibilidad y especificidad de los ensayos se recomienda utilizar PCR anidada, hibridación con sondas internas o una segunda PCR<sup>18,34</sup>.

La biopsia almacenada sin medio de preservación a -20°C mostró los mejores resultados en la amplificación, tanto para los blancos de DNA del parásito como para los de DNA humano; este método de almacenamiento fue el único en el que se observó amplificación en un segmento de los tres empleados para un gen humano de copia única, en el cual el tamaño del fragmento a amplificar era de 450 pb. (Tabla 2, figuras 2,3,4,5 y 6) Este resultado podría indicar que al no usar tampones de preservación y a una temperatura adecuada de almacenamiento, el DNA sufre menos fragmentación permitiendo la amplificación de fragmentos de mayor tamaño<sup>2</sup>. Este resultado corrobora que los fijadores empleados para preservar los tejidos son los responsables del deterioro del DNA, ya sea por fragmentación o por entrecruzamiento<sup>6,10,11,13,15-17,32,33,37,38</sup>.

En el diagnóstico de enfermedades infecciosas de importancia en patología humana y veterinaria se utilizan métodos convencionales para detectar el microorganismo, entre ellos están los microbiológicos, serológicos y de inmunohistoquímica con resultados variables. Los métodos moleculares son una alternativa y representan estudios complementarios que adicionalmente pueden llevar a la clasificación del microorganismo. La utilización de estos estudios se ha ido incrementando, tanto para el diagnóstico individual como para estudios epidemiológicos. Las muestras a utilizar varían dependiendo de la patología, pero en muchos casos es importante su detección en los tejidos, especialmente cuando su cantidad es mínima y no son detectados en los análisis histológicos o inmunohistoquímicos; este es el caso de su detección en muestras provenientes de pacientes con sospecha de enfermedad de Chagas.

Los estudios de tejidos en miocardiopatía chagásica tienen como objetivo determinar que la presencia del parásito es la causante del proceso patológico y no es debida a un proceso autoinmune<sup>32,34,38</sup>. Adicionalmente, permiten clasificar el parásito presente en el tejido, estableciendo el tropismo por el mismo. Por esta razón utilizamos en este estudio una muestra de tejido cardíaco en la cual se detectó la presencia del *T. cruzi* por histopatología. Los resultados de la amplificación de DNA del parásito en los tejidos almacenados en todas las condiciones probadas y con los dos blancos de diferente tamaño (figuras 2,3) muestran que es recomendable la amplificación de DNA de copia múltiple para obtener resultados adecuados en la PCR.

En resumen, de los métodos analizados para conservación de tejidos y calidad de las muestras para su uso en PCR, los mejores resultados se obtuvieron con los tejidos congelados rápidamente a una temperatura de -20°C sin emplear ningún medio de preservación; dado que éste es un método difícil de aplicar en la rutina de un laboratorio de Patología, el método alternativo es el uso como fijador de la formalina tamponada; este método mostró mejores resultados en la electroforesis de agarosa y en la amplificación de los diferentes genes analizados. Es recomendable tener en cuenta el uso del alcohol al 70% cuando se van a realizar estudios de expresión génica, ya que permite el aislamiento adecuado de RNA. En la actualidad se están diseñando nuevos reactivos y métodos para retardar la degradación y obtener el aislamiento inmediato de los ácidos nucleicos, mejorando así la calidad de los mismos y permitiendo su uso en estudios prospectivos. En el caso de las muestras de archivo se requiere hacer estudios adicionales sobre el uso de diferentes métodos de desparafinación, extracción del DNA y analizar otras variables en el procesamiento de las muestras.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Patología de la UIS y al MD. Pedro Luis, Forero por facilitar el material de archivo, al Dr. Julio Cesar Mantilla y a la Dra. Clara Inés Vargas por la lectura y revisión del artículo.

### REFERENCIAS

- 1 KARSTEN S.LI, VAN DEERLIN V., SABATTI C., GILL L., and GESCHWIND D. "An evaluation of tyramide signal amplification and archived fixed and frozen tissue in microarray gene expression analysis." *Nucleic Acids Research*, 2002;30:1-9
- 2 JEWELL S.C., SRINIVASAN M., MCCART L.M., WILLIAMS N., GRIZZLE W.H., LiVolsi V., MacLennan G., and Sedmark D.D. "Analysis of the molecular quality of Human tissues." *American Journal of Clinical Pathology*, 2002;118:733-741
- 3 SCHRAML P., KONONEN J., BUBENDORF L., et al. "Tissues microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types". *Clinical Cancer Research*, 1999;5:1966-1975
- 4 KONONEN J., BUBENDORF L., KALLIONIEMI A., et al. «Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor tissue specimens». *Natural Medicine*, 1998;4:844-847
- 5 BERGER A., BRUSCHEK M., GRETHEN C., et al. "Poor storage and handling of tissues mimics mitochondrial DNA depletion". *Diagnostic Molecular Pathology*, 2001;10:55-59
- 6 REN Z.P., SALLSTROM J., SUNDSTROM C., NISTER M., and OLSSON Y. "Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded material". *Pathobiology*, 2000;68:215-217
- 7 LEHMANN U., and KREIPE H. "Real-Time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies". *Methods*, 2001; 25:409-418
- 8 MUCRO-CACHO C. "In situ PCR. Overview of procedures and applications". *Frontiers in Bioscience* 2, 1997;2:c15-29
- 9 SCHOEPP R.J., MORIN MD., MARTINEZ M., KULESH D., HENSLEY L., GEISBERT T., BRADY D. and JAHRLING P. "Detection and identification of *Variola* virus in fixed human tissue after prolonged archival storage". *Laboratory Investigation*, 2004; 84:41-48
- 10 BIELAWSKI K., ZACZEK A., LISOWSKA U., DYBIKOWSKA A., KOWALSKA A. and FALKIEWICZ B. "The suitability of DNA extracted from differential polymerase chain reaction analyses". *International Journal of Molecular Medicine*, 2001; 8:573-578
- 11 BONIN S., PETRERA F., NICCOLINI B. and STANTA G. "PCR analyses in archival post-mortem tissues". *Journal of Clinical Pathology and Molecular Pathology*, 2003; 56:184-186
- 12 BAXEVANIS A.D. "The Molecular Biology Database Collection". *Nucleic Acids Research*, 2002; 30: 1-12
- 13 RIBEIRO C., PERES L. and PINA-NETO J. "DNA extraction and quantification from touch and scrape preparations obtained from autopsy liver cell". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2004;37:635-642
- 14 LEVINE S., PEREZ G., OLIVARES A., YEE H., HANNA B. and BLAZER M. "PCR-based detection of *Bacillus anthracis* in Formalin-Fixed tissue from a patient receiving Ciprofloxacin". *Journal of Clinical Microbiology*, 2002;40:4360-4362
- 15 KOMIYA T., SHIBATA N., ITO M., TAKAHASHI M and ARAKAWA Y. "Retrospective diagnosis of diphtheria by detection of the *Corynebacterium diphtheriae* tox gene in a Formaldehyde-Fixed throat swab using PCR and sequencing analysis". *Journal of Clinical Microbiology*, 2000;38:2400-2402
- 16 BIALEK R., FEUCHT A., AEPINUS C., JUST-NÜBLING G., ROBERTSON V., KNOBLOCH J. and HOHLE R. "Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue". *Journal of Clinical Microbiology*, 2002;40:1644-1647
- 17 COETSIER C., VANNUFFEL P., BLONDEEL N., DENEJ J.L., COCITO C., and GALA J.L. "Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. paratuberculosis in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues from cattle". *Journal of Clinical Microbiology*, 2000;38:3048-3054



- 18 MULLER N., ZIMMERMANN V., FOSTER U., BIENZ M., GOTTSTEIN B. and WELLE M. "PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction". *Veterinary Parasitology*, 2003;114:223-229
- 19 COOMBS N.J., GOUGH A.C. and PRIMROSE J.N. "Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue". *Nucleic Acids Research*, 1999;27:1-3
- 20 CHAN P.K.S., CHAN D.P.C., TO K.F., YU M.Y., CHEUNG J.L.K. and CHENG A.F. "Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA". *Journal of Clinical Pathology*, 2001;54:401-403
- 21 MASUDA N., OHNISHI T., KAWAMOTO S., MONDEN M. and OKUBO K. "Analysis of chemical modification of RNA from Formalin-Fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples". *Nucleic Acids Research*, 1999;27:4436-4443
- 22 QUACH N., GOODMAN M.F. and SHIBATA D. "In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translation synthesis during PCR". *BMC Clinical Pathology*, 2004;4:1-5
- 23 TUNCER I., KOKSALAN K., DEMIR K., DINCER D., TURKOGLU S., KAYMAK S., CEVIKBAS U., BADUR S., OKTEN A. and CAKALOGLU Y. "Assay of *Mycobacterium tuberculosis* in biopsy specimens taken from hepatic granuloma patients using polymerase chain reaction method". *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 2001;12:1-8
- 24 VIRREIRA M., TORRICO F., TRUYENS C., VEGA A., VEGA C., SOLANO M., CARLIER Y. and SVOBODA M. "Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003;68:574-582
- 25 GUHL F., JARAMILLO C., CARRANZA J. and VALLEJO G. "Molecular characterization and diagnostic of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*". *Archives of Medical Research*, 2002;33:362-370
- 26 MULLIGHAN C.G., MARSHALL S.E., BUNCE M. and WELSH K.I. "Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency". *Genes and Immunity*, 1999;1:137-148
- 27 Lifecodes corporation Quick – Type™. HLA Class II (DR-B, DQ-B, DP-B) sequence specific oligonucleotide typing. (SSO)
- 28 NOGUCHI E., SHIBASAKI M., ARINAMI T., TAKEDA K., YOKOUCHI Y., KAWASHIMA T., YANAGI H., MATSUI A. and HAMAGUCHI H. "Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese". *Clinical and Experimental Allergy*, 1997;28:449-453
- 29 KREMER M., DOMENICO A., FEND F., SCHULZ S., SCHWARZ K., HOEFLE H. and WERNER M. "PCR analysis of IgH-gene rearrangements in small lymphoid infiltrates microdissected from sections of Paraffin-Embedded bone marrow biopsy specimens". *Human Pathology*, 2000;31:847-853
- 30 CELESTE C.N. "Diagnosis of infectious diseases: a Cytopathologist's perspective". *Clinical Microbiology Review*, 1998;11:341-365
- 31 VAGO A., MACEDO A., OLIVEIRA R., ANDRADE L., CHIARI E., GALVAO L., D'AVILA D., PEREIRA M., SIMPSON A., TOSTES S. and PENA S. "Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues". *American Journal of Pathology*, 1996;149:2153-2159
- 32 VAGO A., ANDRADE L., LEITE A., D'AVILA D., MACEDO A., ADAD S., TOSTES S., MOREIRA M., FILHO G. and PENA S. "Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly tissues of patients with chronic Chagas disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs". *American Journal of Pathology*, 2000;156:1805-1809
- 33 HAYDEN R.T., UHL J.R., QIAN X., HOPKINS M.K., AUBRY M.C., LIMPER A.H., LLOYD R.V. and COCKERILL F.R. "Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: Comparison of LightCycler PCR, *in situ* hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture". *Journal of Clinical Microbiology*, 2001;39:2618-2626
- 34 ELIAS F., VIGLIANO C., LAGUENS R., LEVIN M. and BEREK C. "Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of the three patients with chronic Chagas' heart disease". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003;68:242-247
- 35 OLIVARES D., MCCURLEY T., VNENCAK C., CORREA R., COLLEY D. and CARTER C. "Polymerase chain reaction amplification of the three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998;59:563-570
- 36 GILLESPIE J., BEST C., BICHSEL V., COLE K., GREENHUT S., HEWITT S., AHRAH M., GATHRIGHT Y., MERINO M., STRAUSBERG R. et al. "Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies". *American Journal of Pathology*, 2002;160:449-457
- 37 MACABEO M., GINZINGER D., DEKKER N., MCMILLAN A., REGEZI J., WONG D. and JORDAN R. "Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses". *Modern Pathology*, 2001;15:979-987
- 38 LEAL D., MARTÍNEZ I., CUEVAS B. and MARTINEZ J. "Antifreeze solution improves DNA recovery by preserving the integrity of pathogen-infected blood and other tissues". *Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology*, 2000;7:945-946